

孕前女性人群中 MTHFR 基因多态性与叶酸、同型半胱氨酸的相关性

林 宁¹, 官 燮^{2*}, 石 慧¹, 王丽娟¹, 黄丽丽¹, 陈 伟¹, 姜志欣¹, 吴玉璘¹, 许豪勤¹, 岳 平², 孙晓如^{1*}

(¹江苏省生殖健康检验中心, 江苏省计划生育科学技术研究所, 江苏 南京 210036; ²重庆市人口和计划生育科学技术研究院, 重庆 400020)

[摘要] 目的:探讨江苏孕前优生健康检查女性人群中 MTHFR 基因多态性及其与叶酸(FA)、同型半胱氨酸(HCY)之间的关系。方法:选取江苏部分地区参加孕前优生健康检查妇女共 915 例,检测外周全血 MTHFR 基因中与子代先心病发病相关的 rs1801131、rs1801133 两个位点的突变情况;并检测外周血中 HCY 浓度和 FA 水平。结果:915 例中,rs1801131 纯合突变(CC 型)为 3.39%、杂合突变(AC 型)为 28.74%;rs1801133 纯合突变(TT 型)20.55%、杂合突变(CT 型)48.20%。rs1801133 位点中,野生型和纯合、杂合突变基因 3 组之间 HCY 和 FA 的差异均有统计学意义;TT 组 HCY 高于 CC、CT 组,TT 组 FA 低于 CC 组。rs1801131AC 与 rs1801133TT 基因组合的复合突变个体 HCY 水平明显高于 rs1801131AC 与 rs1801133CC、CT 两个基因组合。结论:与先心病相关的 MTHFR 基因两个位点的多态性与外周血中 HCY、FA 的浓度之间有相关性。因此,掌握备孕女性 MTHFR 基因位点的突变情况,可以有针对性地实施孕前和孕早期 FA 增补方案,从而预防可能因有关基因多态性而发生的先天性心脏病。

[关键词] MTHFR 基因多态性;同型半胱氨酸;叶酸;孕前女性

[中图分类号] R715.3

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)10-1293-04

doi:10.7655/NYDXBNS20171014

Correlation of homocysteine and folic acid with MTHFR polymorphism in the preconceptional women

Lin Ning¹, Guan Xie^{2*}, Shi Hui¹, Wang Lijuan¹, Huang Lili¹, Chen Wei¹, Jiang Zhixin¹, Wu Yulin¹, Xu Haoqin¹, Yue Ping², Sun Xiaoru^{1*}

(¹Jiangsu Clinical Laboratory of Reproductive Health, Jiangsu Institute of Planned Parenthood Research, Nanjing 210036; ²Institute for Science & Technology Research of Chongqing Population and Family Planning/Key Laboratory of Birth Defects and Reproductive Health, Chongqing 400020, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the relationship between the polymorphism of MTHFR gene and the level of folic acid and homocysteine in the preconceptional women of Jiangsu Province. **Methods:** A total of 915 preconceptional women were recruited. The mutations of MTHFR rs1801131 and rs1801133 reported associated with congenital heart disease susceptibility were genotyped and the levels of homocysteine (HCY) and folic acid (FA) in peripheral blood were detected. **Results:** Among 915 women, the rate of homozygous mutation and heterozygous mutation of rs1801131 and rs1801133 were 3.39%, 28.74% and 20.55%, 48.20%, respectively. There were significant differences in the level of HCY and FA among rs1801133 CC, CT and TT genotypes. In TT group, HCY was higher than that of CC and CT group, but folic acid was lower than that of CC group. HCY level of compound mutant individuals rs1801131 AC and rs1801133TT was significantly higher than that of the individuals both with rs1801131AC and rs1801133CC or CT. **Conclusion:** It is found that there is a correlation between the concentration of FA and HCY in peripheral blood and the polymorphisms of MTHFR gene which is associated with congenital heart disease. Therefore, for preventing congenital heart disease that might emerge from the genetic polymorphisms, it is expected to help guidance of FA supplementation in preconceptional and early-pregnancy health care that understanding the mutations of MTHFR gene, and their correlation between the concentration of HCY and FA of preconceptional women.

[Key words] MTHFR gene polymorphisms; homocysteine; folic acid; preconceptional women

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(10): 1293-1296]

[基金项目] 重庆市基本科研业务费资助(2015cstc-jbky-01718);重庆市出生缺陷与生殖健康重点实验室科研项目(2015-02);江苏省卫计委科研项目(Z2015-07);江苏省卫计委妇幼项目(F201501);江苏省科技厅计划(BM2015020,2015020-2)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: sunxr@nju.edu.cn; 38476786@qq.com

同型半胱氨酸代谢酶 (MTHFR) 是叶酸(folic acid, FA)和同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)代谢通路中的关键酶, MTHFR 基因的突变可引起 MTHFR 活性降低, 导致体内 FA 与 HCY 代谢异常。育龄妇女体内 FA 和 HCY 水平发生变化与出生缺陷, 尤其是先天性心脏病(先心病)的发生密切相关^[1-4]。在我们早先的研究中也发现了 MTHFR 基因中 rs1801131 位点的突变与子代先心病的发生有关联^[5]。因此, 了解备孕女性中 MTHFR 相关基因位点的多态性分布情况, 以及外周血中 HCY 浓度和 FA 含量的变化情况, 对预防子代先心病的发生, 制定先心病一级预防策略具有重要意义。

本文通过对江苏部分地区 915 例参加孕前健康检查女性的 MTHFR 基因多态性进行分析, 初步了解相关遗传标记物在孕前女性人群中的分布情况, 同时将 rs1801131 和 rs1801133 两个位点的 6 种基因型(rs1801131AA/AC/CC 和 rs1801133CC/CT/TT)进行组合分组, 共组成 9 组, 每组随机选取 15 例(不满 15 例则全部选取), 共 98 例进行外周血 HCY 浓度和 FA 含量的检测, 以期了解 MTHFR 基因多态性和外周血中有关 HCY 和 FA 浓度的变化关系, 为构建子代先心病一级预防的框架提供科学依据。

1 对象和方法

1.1 对象

在江苏省苏南、苏中和苏北各选取 1 个项目点, 在 3 个项目点中选取参加孕前优生健康检查, 并签署“知情同意书”的备孕妇女为研究对象, 其中苏南 310 例, 苏中 300 例, 苏北 305 例, 共计 915 例。平均年龄为(26.10±2.85)岁, 最大 43 岁, 最小 18 岁。

1.2 方法

1.2.1 MTHFR 基因分型检测

采集受检者全静脉血, EDTA 抗凝, 酚-氯仿抽提基因组 DNA。采用美国 ABI 公司设计的 Taqman-MGB 技术和配套试剂盒、仪器, 检测 rs1801131、rs1801133 的基因多态性, 引物和探针设计详见表 1。

每个反应体系为 6 μ L, 其中需检测的 DNA 样本为 1 μ L, 浓度为 10 μ g/ μ L, 50 $^{\circ}$ C 2 min、95 $^{\circ}$ C 10 min 后, 95 $^{\circ}$ C 15 s、60 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环, 反应完成后在 ABI 7900HT 型荧光定量 PCR 仪上读取基因分型结果。

1.2.2 HCY 检测

采集研究对象静脉血, EDTA 抗凝, 及时分离血

表 1 TaqMan 法基因分型引物和探针序列
Table 1 Information for primers and probes by TaqMan allelic discrimination

位点	序列 (5'→3')
rs1801133	引物 F: CACAAAGCGGAAGAATGTGTCA
	R: GACCTGAAGCACTTGAAGGAGAA
	探针 FAM-AAATCGGCTCCCGCA-MGB HEX-TGAAATCGACTCCCG-MGB
rs1801131	引物 F: GGAGGAGCTGCTGAAGATGTG
	R: TCTCCCGAGAGGTAAAGAACAAA
	探针 FAM-AAGACACTTCTTCTCACTG-MGB HEX-AGACACTTGCTTCAC-MGB

浆, 使用贝克曼全自动生化分析仪, 采用循环酶法进行检测。

1.2.3 FA 检测

静脉采集全血, 分离血清。使用 Unicel™ DxI 800 全自动化学发光免疫分析仪进行检测。

1.3 统计学方法

所有数据采用 SPSS 20.0 软件进行统计, 两组间 HCY、叶酸浓度比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 两两比较采用 LSD-*q* 检验。双侧检验 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTHFR 基因型和等位基因频率、MTHFR rs1801131/rs1801133 两位点不同基因型组合情况

MTHFR rs1801131 AA 基因型占 68.87%, AC 基因型占 28.74%, CC 基因型占 3.39%。rs1801133 CC 基因型占 31.26%, CT 基因型 48.20%, TT 基因型占 20.55%。组合基因型中常见的有 AA/CT(32.02%)、AA/TT(19.89%)、AA/CC(15.96%)、AC/CT(15.96%) 等(表 2、3)。

表 2 孕前女性人群中 MTHFR 基因型频数和频率分布
Table 2 Frequency distribution of MTHFR genotypes in preconceptional women

位点	基因型	频数(%)	等位基因	频数(%)
rs1801131	AA	621(68.87)	A	1 505(82.24)
	AC	263(28.74)	C	325(17.76)
	CC	31(3.39)		
rs1801133	CC	286(31.26)	C	1 013(55.36)
	CT	441(48.20)	T	817(44.64)
	TT	188(20.55)		

表 3 孕前女性人群中 MTHFR 两位点不同基因型组合情况
Table 3 Combination of different genotypes of MTHFR two loci in preconceptional women

rs1801131/rs1801133	例数(%)
AA/CC	146(15.96)
AA/CT	293(32.02)
AA/TT	182(19.89)
AC/CC	111(12.13)
AC/CT	146(15.96)
AC/TT	6(0.66)
CC/CC	29(3.17)
CC/CT	2(0.22)
CC/TT	0(0.00)

表 4 rs1801131、rs1801133 不同基因型 HCY、FA 浓度的比较

Table 4 Comparison of HCY and folic acid concentrations in different genotypes of rs1801131 and rs1801133

位点	基因型	例数	HCY(μmol/L)	F 值	P 值	叶酸(nmol/L)	F 值	P 值
rs1801131	AA	45	6.89±1.99	2.137	0.124	10.93±3.89	1.974	0.144
	AC	36	6.29±1.44			10.79±3.68		
	CC	17	6.05±1.04			12.98±4.79		
rs1801133	CC	45	6.15±1.26*	4.247	0.017	12.10±4.22*	3.362	0.039
	CT	32	6.49±1.76*			11.22±3.92		
	TT	21	7.40±2.10			9.41±3.21		

与 rs1801133TT 组比较,*P<0.05。

表 5 rs1801131AA、AC/CC 组间和 rs1801133CC、CT/TT 组间 HCY、FA 浓度的比较

Table 5 Comparison of HCY and folic acid concentrations in rs1801131AA AC/CC group and rs1801133CC CT/TT group

位点	基因型	例数	HCY(μmol/L)	t 值	P 值	叶酸(nmol/L)	t 值	P 值
rs1801131	AA	45	6.99±1.99	1.954	0.055	10.93±3.89	-0.682	0.497
	AC/CC	53	6.21±1.32			11.49±4.15		
rs1801133	CC	45	6.15±1.26	-2.091	0.039	12.10±4.22	1.991	0.049
	CT/TT	53	6.85±1.94			10.50±3.73		

2.4 rs1801131AA/AC/CC 和 rs1801133CC/CT/TT 组合分组的 HCY、FA 浓度的比较

HCY 含量在各组之间进行比较后,差异有统计学意义(P<0.05)。进一步经两两比较后发现,rs1801131AC 与 rs1801133TT 组合的复合突变个体分别高于 rs1801131AC 与 rs1801133CC、CT 两个组合的复合突变个体 27%、28%,经统计分析,差异明显(P<0.05)。rs1801131 AC/rs1801133 TT 复合突变的个体,与 rs1801131 AA/rs1801133 TT 复合突变个体的 HCY 浓度相比,虽然没有明显差异,但数值有升高趋势(表 6)。FA 含量在各组之间的差别无统计学意义(P>0.05)。

3 讨 论

先心病是最常见、也是最严重的先天畸形之一。

2.2 不同基因型 HCY、FA 浓度的比较

rs1801133 位点中,HCY 和 FA 的含量在 CC、CT 和 TT 基因型之间差异明显(P<0.05);TT 组 HCY 分别高于 CC、CT 组 20%、14%(P<0.05);TT 组 FA 低于 CC 组 16%,有明显差异(P<0.05)。而 rs1801131 位点中,HCY 和 FA 含量在 AA、AC 和 CC 基因型之间的差异无统计学意义(表 4)。

2.3 野生型与突变型之间 HCY、FA 浓度的比较

在 rs1801131 位点中,AA、AC/CC 两组之间 HCY 和 FA 含量无明显差异;而在 rs1801133 位点中,CT/TT 组的 HCY 浓度高于 CC 组 10%、CT/TT 组的 FA 浓度低于 CC 组 13%,均有明显差异(P<0.05,表 5)。

表 6 不同基因型组合的 HCY 浓度的比较

Table 6 Comparison of HCY concentration in different genotype combinations

rs1801131/rs1801133	例数	HCY(μmol/L)	P 值*
AC/CC	15	6.05±1.41	0.018
AC/CT	15	5.99±1.31	0.014
AA/TT	15	7.30±2.39	0.641
AC/TT	6	7.67±1.27	-

* 与 AC/TT 比较。

中国出生缺陷防治报告显示,2011 年全国出生缺陷监测系统统计的围产期先心病发病率达到 40.95/10 000。先心病居我国 5 岁以下儿童死亡原因的 4 位和先天畸形的首位[6]。早些的研究[7-8]表明,父母 MTHFR 基因与子代先心病发生有关,MTHFR 基因

突变可增加子代发生先心病的风险。而 MTHFR 是 FA 和 HCY 代谢途径中的关键酶, MTHFR 基因位点的突变能够引起酶的活性下降, 进一步导致体内 FA 水平下降、HCY 水平增高。

本研究显示, rs1801133 纯合突变个体(TT 基因型)占 20.55%, 杂合突变个体(CT 基因型)占 48.20%; rs1801131 纯合突变个体(CC 基因型)占 3.39%、杂合突变个体(AC 基因型)占 28.74%。

通过测定外周血 HCY 和 FA 的含量, 发现其浓度在 rs1801133CC、CT 和 TT 基因型之间差异明显($P < 0.05$), TT 组明显表现为高 HCY、低 FA; rs1801133 CT/TT 组的 HCY 浓度高于 CC 组 10%, 而 FA 水平低于 CC 组 13%, 差异均有统计学意义。从以上结果中可间接看到 rs1801133 位点的突变可引起酶活性下降, 与文献报道一致^[9]。

另有研究者认为^[10], rs1801131 的杂合 AC 基因型和 rs1801133 杂合 CT 基因型复合突变的杂合子个体同样表现出 rs1801133 纯合的 TT 基因型突变个体的高 HCY 和低 FA 现象。

本研究将 rs1801131 和 rs1801133 两个位点不同基因型进行组合分组后发现, 不同基因型的组合(复合突变个体)相互之间 HCY 浓度有差异, 但 rs1801131AC/rs1801133CT 复合突变的杂合子个体与 rs1801131AC/rs1801133CC(野生型)组合的个体进行比较, 有关结果并未达到文献报道的差异程度。而 rs1801131AC/rs1801133TT 复合突变的个体与 rs1801131AC/rs1801133CC、rs1801131AC/rs1801133CT 两种复合突变的个体相比较, HCY 浓度有明显差异。同时, rs1801131AC/rs1801133TT 复合突变的个体, 与 rs1801131AA(野生型)/rs1801133TT 复合突变个体的 HCY 浓度相比, 虽然没有明显差异, 但数值有升高趋势。

通过研究发现, 江苏部分地区孕前女性人群中存在一定比例的 MTHFR 基因突变, 与先心病相关的 MTHFR 基因 rs1801133 位点的突变以及 rs1801131 和 rs1801133 两个位点不同突变基因型组成的不同复合突变, 对于体内 HCY 和 FA 水平表现出了高 HCY、低 FA 的现象。有研究表明^[11-12], HCY 代谢异常是诱发先心病、神经管畸形以及血管疾病的一个独立危险因素, 并认为 HCY 的代谢异常在先心病发病机制中起着重要的作用。因此应特别关注孕前女性人群中 rs1801133 位点的突变, 尤其是纯合突变(TT 基因型)以及 rs1801131AC/

rs1801133TT 复合突变个体的有关指标。

在调查的孕前女性人群中, 表现为高 HCY、低 FA 现象的 rs1801133 纯合突变个体(TT 基因型)占 20.55%、rs1801131AC/rs1801133TT 复合突变的个体也有 0.66%, 所以针对有生育愿望的女性人群, 有必要在孕前了解与先心病相关风险基因的携带情况, 评估个体的 FA 利用能力。掌握携带风险基因人群的血液中 HCY 和 FA 的含量, 有利于为孕前高危人群制定减少先心病发生的个性化增补 FA 方案, 为建立先心病的一级预防框架提供依据, 最大程度地降低先心病的发生。

[参考文献]

- [1] 王苏梅, 王磊光. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与出生缺陷[J]. 国外医学计划生育分册, 2005, 24(1): 39-41
- [2] 蒋幼芳, 梅瑾, 张闻, 等. 母亲 MTHFR 677C/T 多态性和孕期状况与子代发生先天性心脏病的相关性研究[J]. 中华流行病学杂志, 2015, 36(10): 1072-1076
- [3] 朱文丽, 刀京晶, 成君, 等. 血清同型半胱氨酸及叶酸水平与先天性心脏病的关系[J]. 卫生研究, 2005, 34(6): 740-743
- [4] 罗金英, 颜建英. 孕期高同型半胱氨酸血症与胎儿先天性心脏病[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(29): 4909-4911
- [5] Shi H, Yang S, Liu Y, et al. Study on environmental causes and SNPs of MTHFR, MS and CBS genes related to congenital heart disease [J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0128646
- [6] 储晨, 桂永浩. 先天性心脏病产前诊断对围产儿结局的影响[J]. 中华围产医学杂志, 2014, 17(10): 706-710
- [7] 房渝, 胡建国. 亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与先天性心脏病[J]. 医学研究生学报, 2009, 22(7): 762-766
- [8] 李栋, 于坤坤, 马衍辉, 等. 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶基因多态性与先天性心脏病的关联研究[J]. 卫生研究, 2015, 44(6): 933-938
- [9] 赵加洪, 李瑛, 鲁衍强, 等. MTHFR 基因多态性检测在生殖健康领域的临床价值[J]. 中国妇幼卫生杂志, 2015, 6(5): 79-83
- [10] 云小云, 欧凤荣. 叶酸缺乏与出生缺陷相关性研究进展[J]. 实用药物与临床, 2016, 19(2): 244-248
- [11] Wolf M, Basson CT. The molecular genetics of congenital heart disease: a review of recent developments[J]. Curr Opin Cardiol, 2010, 25(3):192-197
- [12] 石春红, 严倩, 姜凌. 孕妇血清叶酸、同型半胱氨酸的水平与胎儿先天性心脏病的相关性[J]. 山东医药, 2015, 55(37): 71-72

[收稿日期] 2017-04-23